

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III

(Medicina y Cirugía Bucofacial)

**MÁSTER EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS 2013-2014**

**TRABAJO DE FIN DE MÁSTER**



VALIDACIÓN DE CUATRO TÉCNICAS PARA LA  
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PATÓGENOS  
PERIODONTALES EN SANGRE

Tutor: *Dra. Elena Figuero Ruiz*

Autor: *Elena Ruiz-Capillas Sala*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a todos los participantes que voluntariamente se han prestado a colaborar en esta investigación.

A la Dra. Elena Figuero por aceptar guiarme en este viaje, por todas sus enseñanzas y explicaciones, y por su tiempo y dedicación.

Igualmente, a María José Marín, miembro del equipo de investigación por enseñarme a desenvolverme en el laboratorio y todas las técnicas, por ayudarme a entender cada detalle soportando todas mis preguntas y por estar siempre ahí para facilitar todo lo posible.

También agradecer al resto del equipo Nagore Ambrosio, Itziar González y Ana O'Connor por resolver todas las dudas del día a día sin las que habría sido imposible terminar el trabajo. A Rosa María Simón pieza clave en la extracción de sangre, sin la cual esta investigación no existiría.

Muchas gracias.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1 Enfermedades periodontales.....	5
1.2 Periodontitis como factor de riesgo de enfermedades sistémicas .....	6
1.3 Bacteriemias de origen oral.....	9
1.4 Técnicas de análisis de bacteriemias de origen oral.....	11
1.5 Justificación .....	12
1.6 Hipótesis .....	13
1.7 Objetivos .....	13
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
2.1 Diseño.....	14
2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo .....	14
2.3 Cultivo de las diluciones en PBS (Técnica de referencia).....	14
2.4 Obtención de sangre .....	15
2.5 Contaminación de la sangre .....	15
2.6 Procesado de muestras.....	16
2.7 Límite de detección .....	19
2.8 Análisis estadístico .....	20
3. RESULTADOS.....	21
3.1 Descripción general de los experimentos. ....	21
3.2 Límite de detección, prevalencia, sensibilidad y especificidad.....	23
3.3 Correlación con la técnica de referencia .....	24
4. DISCUSIÓN .....	25
5. CONCLUSIONES.....	28
6. BIBLIOGRAFÍA .....	29
ANEXO 1: INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	40
ANEXO 2: TABLAS DE RESULTADOS.....	43



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son un conjunto de enfermedades de naturaleza infecciosa que afectan a los tejidos de soporte del diente (periodonto). Entre el 85 y 94% de la población española mayor de 35 años presenta algún problema relacionado con las encías (Llodra-Calvo, 2012). La principal división entre estas enfermedades se realiza entre enfermedades gingivales y periodontitis (Armitage, 1999). Dentro del primer grupo, la gingivitis es la forma más común y se define por una reacción inflamatoria reversible de los tejidos supraalveolares ante la acumulación de placa bacteriana (Loe et al., 1965). Por otro lado, la periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica, progresiva y multifactorial que produce la destrucción irreversible de los tejidos periodontales más profundos, siendo la pérdida de las piezas dentales su consecuencia última (Alwan, 2011).

Su principal factor etiológico es la presencia de una infección compleja polimicrobiana, agrupada en un biofilm subgingival (Listgarten, 1988, Sanz et al., 2011). Más de 700 especies bacterianas diferentes han sido identificadas en la cavidad oral y estas podrían suponer únicamente un 50% del total de bacterias presentes (Paster et al., 2006). De ellas, más de 400 han sido encontradas en la placa subgingival (Paster et al., 2006), sin embargo, parece que un número reducido está en relación con el inicio o la progresión de la periodontitis (Moore and Moore, 1994). En 1994, Haffajee y Socransky propusieron una serie de criterios, adaptados de los postulados clásicos de Koch, para que una de esas bacterias pudiera ser considerada patógeno periodontal (Haffajee and Socransky, 1994). Basándose en estos criterios el “World Workshop in Periodontology” (1996) consideró que tres bacterias tenían evidencia de fuerte asociación con la periodontitis (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tanerella forsythia*). Otras especies, como *Treponema denticola* (Listgarten and Socransky, 1964, Kigure et al., 1995), *Prevotella intermedia* (Tanner et al., 1979, Tanner et al., 1996), *Fusobacterium nucleatum* (Papapanou et al., 2000, Van der Velden et al., 2003) o

*Campylobacter rectus* (Moore et al., 1983, Dzink et al., 1985), también parecen ser agentes etiológicos de distintas enfermedades periodontales destructivas, aunque existe menor evidencia al respecto.

La placa subgingival representa un complejo biofilm, compuesto de bacterias envueltas en una matriz de polímeros extracelulares. Previo a la colonización por los verdaderos periodontopatógenos, se observa una aparición temprana de estreptococos del grupo *viridians*, que proveen receptores, facilitando la posterior coagregación de otros microorganismos más nocivos. Estas bacterias son mayoritarias en la placa tras 24 horas de evolución (Nyvad and Kilian, 1987).

A pesar del papel fundamental de las bacterias en el inicio y progresión de la enfermedad, la interacción con la respuesta inmune del huésped es responsable del daño a los tejidos más profundos (Loe, 1983). A su vez, esta respuesta está modulada por factores genéticos y ambientales (Figura 1) (Kornman, 2008), como el tabaco (Bergstrom, 2006) y la diabetes (Khader et al., 2006).

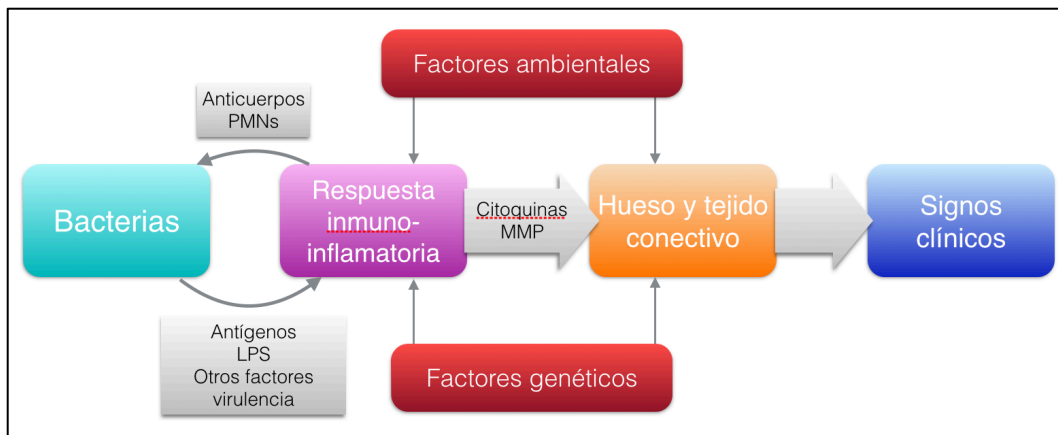


Fig. 1. Patogénesis de la periodontitis. Adaptado de Kornman 2008

## 1.2 Periodontitis como factor de riesgo de enfermedades sistémicas

Además de las consecuencias orales de la periodontitis, en las últimas décadas ha surgido cierta evidencia implicando a la enfermedad periodontal como factor de riesgo de algunas enfermedades sistémicas, tales como la diabetes mellitus (Borgnakke et al., 2013), el bajo peso al nacimiento (Ide and Papapanou, 2013) o las

enfermedades cardiovasculares (Beck and Offenbacher, 2001), entre otras.

La ***diabetes mellitus*** es una enfermedad común y multifactorial relacionada la periodontitis de manera bidireccional. Existe clara evidencia epidemiológica de que los pacientes con periodontitis tienen niveles más altos de glucosa en sangre y se encuentran peor controlados, y de una relación directa entre la severidad de la periodontitis y complicaciones de la diabetes tipo 2 (Borgnakke et al., 2013). Además, estudios recientes sugieren con menor evidencia que los pacientes con periodontitis severa estarían en mayor riesgo de desarrollar periodontitis (Chapple and Genco, 2013). En cuanto al tratamiento, también está ampliamente comprobada la mejoría en el control glicémico de los pacientes diabéticos tras el tratamiento periodontal (Engebretson and Kocher, 2013).

Otra consecuencia sistémica de la periodontitis es el riesgo de **resultados adversos del embarazo** entre las pacientes con periodontitis. El nacimiento pretérmino (<37 semanas), con bajo peso (<2500mg), la preeclampsia o el aborto han sido vinculadas a la presencia local o sistémica de mediadores inflamatorios. Todos ellos han sido asociados con una mayor prevalencia de enfermedad periodontal en las madres gestantes (Offenbacher et al., 1996, Boggess et al., 2006, Sanz and Kornman, 2013). Sin embargo, la fuerza de asociación entre los parámetros clínicos de la periodontitis y alguno de estos eventos es modesta (Ide and Papapanou, 2013)

Por último, se ha encontrado cierta asociación entre las enfermedades periodontales y las **enfermedades cardiovasculares**. Las enfermedades cardiovasculares (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular) son la primera causa de muerte en el mundo y están principalmente producidas por la aterosclerosis, un estado en el que las arterias quedan obstruidas por unas placas fibrolipídicas denominadas ateromas (Alwan, 2011). En 1989 Mattila y cols., realizaron un estudio comparando la salud oral (caries, periodontitis y pericoronaritis) de pacientes que habían sufrido infarto agudo de miocardio con la de pacientes sanos y, tras ajustar otros factores de riesgo, encontraron asociación entre ambas; aunque de naturaleza dudosa (Mattila et al., 1989). A raíz de ese



estudio comenzó a analizarse la conexión entre las enfermedades cardiovasculares y la enfermedad periodontal llegando a la conclusión actual de que existe evidencia epidemiológica fuerte y consistente de que la periodontitis aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas (Tonetti and Van Dyke, 2013).

Se han propuesto diferentes hipótesis que tratan de explicar esta asociación entre enfermedades sistémicas y enfermedades periodontales.

- a) En un extremo, existen teorías sobre la presencia de factores comunes entre la periodontitis y dichas enfermedades o un fenotipo común (Schaefer et al., 2009, Sanz and Kornman, 2013) en lugar de una relación real entre ambas.
- b) Por otro lado, investigaciones más recientes encuentran vías a través de las cuales la periodontitis influye en estas enfermedades
  - Vía indirecta: los pacientes con infección periodontal crónica se pueden encontrar en un estado sistémico de inflamación, evidenciado por un aumento de mediadores proinflamatorios a nivel sistémico (Bouchard et al., 2010). Estos mediadores pueden propiciar el desarrollo de placas de ateroma (Reyes et al., 2013), provocar resultados adversos del embarazo (Sanz and Kornman, 2013) y aumentar el riesgo de desarrollar diabetes o alguna de sus complicaciones (Chapple and Genco, 2013), dado que todas estas enfermedades tienen un importante origen inflamatorio.
  - Vía directa: algunas bacterias como *Porphyromonas gingivalis* o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* poseen factores de virulencia que se liberan a la sangre (endotoxemias) que pueden inducir respuestas inflamatorias en las células endoteliales (Reyes et al., 2013) y en los tejidos placentarios (Madianos et al., 2013). Por ultimo, dado que las infecciones periodontales generan bacteriemias (Sconyers et al., 1973), una vez en la sangre, estas bacterias pueden alcanzar la placenta o el liquido amniótico produciendo infecciones ectópicas o inflamación (Madianos et al., 2013), así como penetrar en

las células endoteliales dañándolas (Reyes et al., 2013).

### 1.3 Bacteriemias de origen oral

El torrente sanguíneo es estéril en condiciones normales y la presencia de bacterias en sangre detectables con técnicas de laboratorio se define como bacteriemia (Bolukbasi et al., 2012).

Se ha estimado que en los pacientes con periodontitis la superficie de contacto entre el epitelio dentogingival y el biofilm bacteriano subgingival puede alcanzar los 20 cm<sup>2</sup> (Hujoel et al., 2002) y que dicho epitelio de apenas 10 capas de células se encuentra sobre un tejido conectivo muy vascularizado. Además, en estos pacientes ocurren con frecuencia ulceraciones y rupturas de la membrana basal (Nisengard, 1987) pudiendo así pasar bacterias al torrente sanguíneo (Parahitiyawa et al., 2009).

Las bacteriemias de origen oral suelen ser transitorias, aunque pueden producir infecciones a distancia como la endocarditis infecciosa (Carmona et al., 2002, Bascones-Martinez et al., 2009). Las bacterias orales predominantemente implicadas en esta complicación son estreptococos del grupo *viridians* (Netzer et al., 2000, Sandre and Shafran, 1996). Por otro lado, patógenos periodontales, como *A. actinomycetemcomitans* o *P. gingivalis*, han sido identificados en placas de ateroma humanas (Chiu, 1999, Cairo et al., 2004, Elkaim et al., 2008, Figuero et al., 2011, Figuero et al., 2014) y se ha demostrado su capacidad para inducir aterogénesis en estudios experimentales a través de diferentes mecanismos (Figuero et al., 2011): (1) favoreciendo la adherencia de leucocitos al endotelio (Choi et al., 2005), (2) favoreciendo la migración de monocitos (Choi et al., 2005), (3) promoviendo la transformación de macrófagos en células espumosas (Giacca et al., 2004, Miyakawa et al., 2004), (4) por su efecto coagulante (Nicu et al., 2009) y (5) fomentando la ruptura de las placas de ateroma (Tuomainen et al., 2008).

Estas bacteriemias orales han sido ampliamente descritas en la literatura tras intervenciones odontológicas como el raspado y alisado radicular o la exodoncia (Heimdahl et al., 1990, Rajasuo et al., 2004, Lockhart et al., 2009, Maharaj

et al., 2012). Sin embargo, no solo las actuaciones profesionales inducen el paso de bacterias a la sangre, sino que también se producen tras actividades de la vida diaria, como el uso de la seda dental (Zhang et al., 2013). La intensidad de este tipo de bacteriemia puede ser menor, pero estudios recientes sugieren que el efecto acumulativo podría ser mayor a largo plazo (Roberts, 1999, Reyes et al., 2013).

Los resultados en cuanto a la prevalencia de bacterias en sangre según el procedimiento de exposición oscilan entre un 0 y un 90% (Tabla 1):

*Tabla 1.* Prevalencia de bacteriemia encontrada en estudios previos según procedimiento de exposición.

Procedimiento de exposición	Prevalencia	Referencias
Raspado y alisado radicular	30-90%	(Heimdahl et al., 1990, Lofthus et al., 1991, Forner et al., 2006, Lafaurie et al., 2007, Maestre et al., 2008, Perez-Chaparro et al., 2009, Morozumi et al., 2010, Castillo et al., 2011, Waghmare et al., 2013, Zhang et al., 2013)
Sondaje periodontal	16-46%	(Daly et al., 1997, Daly et al., 2001, Kinane et al., 2005)
Cirugía periodontal	46,6%	(Asi et al., 2010)
Eliminación de suturas	5-16%	(King et al., 1988, Giglio et al., 1992)
Profilaxis con ultrasonidos	13-33%	(Kinane et al., 2005, Cherry et al., 2007)
Cepillado dental	0-40%	(Schlein et al., 1991, Roberts et al., 1997, Bhanji et al., 2002, Hartzell, 2005, Kinane et al., 2005, Forner et al., 2006, Lucas et al., 2008, Lockhart et al., 2009, Jones et al., 2010, Maharaj et al., 2012)
Hilo interdental	20-40%	(Lineberger and De Marco, 1973, Crasta et al., 2009, Zhang et al., 2013)
Masticación	0-38,5%	(Cobe, 1954, Roberts et al., 1997, Forner et al., 2006, Murphy et al., 2006, Fine et al., 2010)

La variabilidad de resultados entre los estudios se puede deber a su heterogeneidad en cuanto al momento de la toma de las muestras, el diagnóstico periodontal de los sujetos, el procedimiento de exposición y/o la técnica de análisis empleada.

#### 1.4 Técnicas de análisis de bacteriemias de origen oral

La medición es un proceso inherente tanto a la práctica como a la investigación clínica que conlleva siempre algún grado de error. Factores asociados a los individuos, al observador o al sistema de medida pueden influir en la variación de las mediciones.

La calidad de una medida depende tanto de su precisión como de su exactitud. Mientras que la exactitud expresa el grado en el que realmente se mide el fenómeno de interés, la precisión indica hasta qué punto se obtienen los mismos valores al efectuar la medición en más de una ocasión, bajo condiciones similares. El que una medida sea muy precisa no implica, sin embargo, que sea necesariamente válida.

En los estudios que tratan de evaluar la validez de una medida se comparan los resultados con los obtenidos mediante una prueba de referencia (*gold standard*). Cuando existen diferentes métodos de medida para un mismo fenómeno, es interesante estudiar hasta qué punto los resultados obtenidos con ambos instrumentos son equivalentes.

Los sistemas más utilizados para la detección e identificación de las bacteriemias son el hemocultivo-BACTEC y la lisis-centrifugación, y en los últimos años se ha incorporado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**BACTEC** (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, EE.UU) es un sistema automatizado para el crecimiento y detección de crecimiento bacteriano en sangre. Es una técnica cualitativa en el que la sangre se cultiva en frascos con medio bifásico. Un sistema de lectura automatizado detecta CO<sub>2</sub> y variaciones de pH por fluorescencia. Es un sistema muy usado a nivel hospitalario y también en numerosos estudios de bacteriemias orales (Hutchinson et al., 1992a, Hutchinson et al., 1992b, Daly et al., 2001, Lucas et al., 2002, Kinane et al., 2005, Murphy et al., 2006, Diz Dios et al., 2006, Tomas et al., 2007a, Tomas et al., 2007b, Tomas et al., 2008, Bahrani-Mougeot et al., 2008, Crasta et al., 2009, Lockhart et al., 2009, Pineiro et al., 2010, Bolukbasi et al., 2012, Maharaj et al., 2012).

El análisis microbiológico mediante **lisis-centrifugación** consiste en inocular la sangre en un tubo específico que contiene, entre otras cosas, saponinas para lisar las células humanas y limpiar así la muestra; centrifugarlo para separar los microorganismos del plasma, y sembrar el sedimento en placas de cultivo convencionales (Dorn and Smith, 1978). Esta técnica o alguna de sus variantes ha sido utilizada en números estudios (Heimdahl et al., 1990, Hutchinson et al., 1992a, Lucas et al., 2002, Forner et al., 2006, Cherry et al., 2007, Lucas et al., 2008, Jones et al., 2010, Zhang et al., 2013).

**La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** es una técnica de biología molecular que, partiendo del ADN extraído de las muestras, amplifica exponencialmente determinadas secuencias de ADN mediante ciclos a distintas temperaturas, lo que permite detectar la presencia de ADN bacteriano y, según la variante, identificar la bacteria y cuantificar su número (Kinane et al., 2005, Bahrani-Mougeot et al., 2008, Lockhart et al., 2009, Castillo et al., 2011).

**Los métodos de cultivo** son los más usados para definir la composición de la placa subgingival y son el método de referencia con el que comparar cualquier nueva técnica de diagnóstico microbiológico periodontal (Sanz et al., 2004). Hasta ahora no se ha usado este método tan sencillo y contrastado en estudios sobre bacteriemia. El problema fundamental del cultivo es que sólo un 50% de las especies subgingivales, son cultivables.

Algunos artículos han comparado *in vivo* los resultados obtenidos con distintas técnicas (Hutchinson et al., 1992a, Hutchinson et al., 1992b, Lucas et al., 2002, Kinane et al., 2005, Savarrio et al., 2005, Castillo et al., 2011) llegando a conclusiones diferentes, aunque parece que, según los estudios más recientes, las técnicas moleculares (PCR) serían las de mayor sensibilidad (Reyes et al., 2013).

## 1.5 Justificación

La detección de patógenos periodontales en sangre es el punto clave que permitiría confirmar una vía de asociación directa entre las enfermedades

periodontales y ciertas enfermedades sistémicas. En estudios previos se han utilizado diferentes técnicas para la detección de bacteriemias orales con resultados contradictorios. Algunos autores han comparado la fiabilidad de estos sistemas (Hutchinson et al., 1992a, Hutchinson et al., 1992b, Lucas et al., 2002, Kinane et al., 2005, Castillo et al., 2011, Savarrio et al., 2005), sin embargo, no se ha realizado hasta ahora una validación *in vitro* de técnicas para la detección de patógenos periodontales en sangre.

## 1.6 Hipótesis

La técnica de biología molecular (PCR) es la técnica más adecuada para la detección de bacterias de origen periodontal en sangre.

## 1.7 Objetivos

- Comparar los datos de prevalencia, sensibilidad, especificidad y límite de detección obtenidos con cuatro técnicas (hemocultivo-BACTEC, lisis-centrifugación, PCR cuantitativa a tiempo real [qPCR] y cultivo directo) para el análisis de bacteriemias mono-especie de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *Streptococcus oralis*, y su correlación con una técnica de referencia (PBS).
- Identificar la técnica de elección para el estudio de bacteriemias causadas por patógenos periodontales.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Diseño

Es un estudio *in vitro* en el que se comparan las técnicas de cultivo directo, hemocultivo BACTEC, lisis-centrifugación, y qPCR para sangre contaminada con tres concentraciones conocidas de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, o *S. oralis*.

### 2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de referencia empleadas para contaminar la sangre correspondieron a *Streptococcus oralis* CECT 907T, *A. actinomycetemcomitans* DSMZ 8324 y *P. gingivalis* ATCC 33277. Estas bacterias crecieron en placas de medio agar sangre (Blood Agar Oxoid No 2; Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), suplementado con sangre de caballo al 5% (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido), hemina (5.0 mg/l) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y menadiona (1mg/l) (Sigmca, St. Louis, MO, EE.UU.) en condiciones de anaerobiosis (10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, y N<sub>2</sub> balanceado) a 37°C durante 24-72 horas.

A partir de una colonia aislada de un cultivo fresco de la bacteria en placa, se preparó un cultivo bacteriano en medio líquido BHI (*Brain Heart Infusion*; Becton, Dickinson and Company; EE.UU.). Este cultivo se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, medido por espectrofotometría a densidad óptica (DO) 550 nm.

### 2.3 Técnica de referencia

Dado que no existe en la literatura ninguna técnica de referencia para detectar periodontopatógenos en sangre se utilizó para conocer la concentración real de bacterias con la que se estaba trabajando el método de referencia en microbiología oral. Se prepararon diluciones seriadas (1:10) de los cultivos bacterianos en tampón fosfato salino (PBS). A continuación, se sembraron en placas de medio agar sangre por duplicado, las diluciones 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup> y 10<sup>-8</sup>, además de

PBS sin contaminar como control negativo. Tras 7 días de incubación en medio anaerobio se contabilizó y calculó la concentración de bacterias presente.

## 2.4 Obtención de sangre

La sangre se extrajo de sujetos periodontalmente sanos que participaron voluntariamente en el estudio. Tras recibir información sobre el mismo y firmar la hoja de consentimiento informado (Anexo 1) se examinó el estado periodontal de cada uno y, tras confirmar la ausencia de patología, se acordó otra visita para la toma de las muestras. La extracción se realizó en el quirófano de implantes de la Clínica del Posgrado de Periodoncia (Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid).

Se tomó una vía en la vena antecubital para la toma de muestras de sangre periférica mediante técnica convencional. La sangre se inoculó en tubos Isolator® (Oxoid Limited, Basingstoke, Hants, Reino Unido) para la técnica de lisis-centrifugación y en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Vacutainer™, Becton Dickinson, San Agustín de Guadalix, Madrid, España) para las demás técnicas, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (Loza-Fernández et al., 2003). De cada sujeto se extrajeron 75 ml de sangre, utilizados para un único experimento con una sola bacteria.

## 2.5 Contaminación de la sangre

Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense, Madrid), el mismo día de la extracción. De cada muestra de sangre se prepararon cuatro series con alícuotas de:

- 1 ml de sangre para analizar mediante qPCR,
- 2 ml para cultivo directo,
- 5 ml para BACTEC
- y 10 ml para lisis-centrifugación cada una.



Cada serie se contaminó a una de las tres concentraciones determinadas ( $10^4$ ,  $10^2$  y  $10^1$  unidades formadoras de colonias [UFC]/ml), además de preparar controles negativos de sangre sin contaminar.

## 2.6 Procesado de muestras

Cada muestra se analizó mediante cuatro técnicas. Los análisis mediante cultivo directo, lisis-centrifugación y qPCR se realizaron de forma inmediata en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología (Universidad Complutense). Las muestras para análisis mediante hemocultivo-BACTEC, se enviaron al Departamento de Microbiología del Hospital General Cies (Vigo, Pontevedra) para su análisis en las siguientes 24 horas.

### Análisis mediante cultivo directo

Cada muestra de sangre de dos ml se sembró en placas de agar sangre (Figura 2) y de medio Dentaïd-1 (Figura 3) (Alsina et al., 2001), selectivo para *A. actinomycetemcomitans*, distribuida de la siguiente forma: cinco placas con 100 µl y una placa con 500 µl para cada uno de los dos medios.



Fig. 2 Placa de agar sangre



Fig. 3 Placa de Dentaïd-1

Las placas de agar sangre se examinaron tras 7 y 14 días de incubación anaeróbica (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> a 37°C). Las placas Dentaïd-1 permanecieron entre tres y cinco días a 37°C en aire con 5% de CO<sub>2</sub>.

La presencia y la cantidad de *P. gingivalis* y *S. oralis* se analizó en las placas de agar no selectivo. La identificación de las especies bacterianas seleccionadas se basó

en la tinción de Gram, la morfología celular, la aerotolerancia, la producción de catalasa y se confirmó mediante el empleo de test bioquímicos estándar (RapID™ ANA II System; Remel, Lenexa, KS, EE.UU).

Los recuentos totales de *A. actinomycetemcomitans* se realizaron en las placas de Dentaïd-1. La identificación se basó en la típica morfología de su colonia (estructura interna de estrella), la reacción catalasa positiva y el uso de una serie de enzimas específicas (RapID™ NH System, Remel, Lenexa, KS, EE.UU).

#### **Análisis mediante lisis-centrifugación**

Cada alícuota de 10 ml de sangre fue inoculada en un tubo Isolator® (Oxoid Limited, Basingstoke, Hants, Reino Unido). A continuación se contaminó la sangre con una de las bacterias, se agitó el tubo y, tras dejarlo reposar 20 minutos, se centrifugó a 1.500rpm durante 30 minutos. Tras descartar el sobrenadante, se vorteoó el sedimento (dos ml aproximadamente) y se sembró mediante estrías en placas de agar sangre y medio Dentaïd-1 siguiendo el mismo procedimiento descrito para la técnica de cultivo directo.

#### **Análisis mediante hemocultivo-BACTEC**

Los 5 ml de las muestras se inocularon y cultivaron en frascos BACTEC Plus Anaerobic/F Medium (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, EE.UU) (Figura 4), aplicando las recomendaciones de la SEIMC (Loza-Fernández et al., 2003) y se procesaron en el sistema de lectura automatizado BACTEC 9420 (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD, EE.UU) en medio anaerobio. Este sistema detecta CO<sub>2</sub> y variaciones de pH por fluorescencia en fase sólida y VITAL en fase líquida (tecnología fluorescente homogénea), como expresión de crecimiento bacteriano.



Fig. 4 frascos BACTEC Plus Anaerobic/F Medium

A cada hemocultivo positivo se le realizó una tinción de Gram y posterior subcultivo en medio agar Schaedler e incubación en atmósfera de anaerobiosis. Finalmente se identificaron las bacterias aisladas aplicando pruebas bioquímicas Vitek (BioMérieux, Inc, EE.UU) para bacterias anaerobias.

### **Análisis mediante PCR cuantitativa**

#### *Extracción de ADN*

El análisis mediante qPCR requiere de la extracción previa del ADN bacteriano de las muestras de sangre. Ésta se realizó de forma inmediata mediante un kit comercial diseñado para este fin, MoYsis Complete5 (Molzgm GmbH & Co.KG, Bremen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN fueron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  y conservados hasta su posterior análisis.

#### *Amplificación mediante qPCR*

Las muestras, de un volumen final de 20  $\mu\text{l}$ , contuvieron una solución de master mix con: 10  $\mu\text{l}$  de 2x TaqMan master mix (LightCycler® 480 Probes Master, Roche), concentraciones óptimas de primers y sondas para cada bacteria (Tabla 2), y 5  $\mu\text{l}$  de ADN extraído de las muestras contaminadas y sin contaminar.

Las concentraciones y secuencias de los primers y sondas empleados figuran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Primers y sondas empleadas para la cuantificación del ADN genómico para cada bacteria.

Bacteria	Secuencia y Artículo de referencia 5' --> 3'	Concentración (nM)
<i>Pg</i>	(Boutaga et al., 2003)	
Forward	GCGCTCAACGTTTCAGCC	300
Reverse	CACGAATTCGCCTGC	300
Taqman	6FAM-CACTGAACTCAAGCCCGGCAGTTTCAA-TAMRA	300
<i>Aa</i>	(Boutaga et al., 2005)	
Forward	GAACCTTACCTACTCTTGACATCCGAA	300
Reverse	TGCAGCACCTGTCTCAAAGC	300
Taqman	6FAM-AGAACTCAGAGATGGGTTTGTGCCTTAGGG-TAMRA	100
<i>So</i>	(Sanchez et al., 2014)	
Forward	CAACGATACATAGCCGACCTGAG	900
Reverse	TCCATTGCCGAAGATTCC	900
Taqman	6FAM-CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA-BBQ	300

*Aa* = *A. actinomycetemcomitans*; *Pg* = *P. gingivalis*; *So* = *S. oralis*

Las muestras fueron sometidas a un ciclo inicial de amplificación de 95°C durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y 60°C durante un minuto. Los datos se analizaron por duplicado mediante el termociclador LightCycler® 480 (Roche).

La cuantificación se realizó mediante el empleo de curvas estándar preparadas en cada experimento mediante diluciones seriadas desde  $10^1$  a  $10^9$  UFC/ml de ADN genómico purificado de cada una de las tres especies bacterianas.

## 2.7 Límite de detección

Para establecer el límite de detección con qPCR se prepararon controles negativos (NTC), compuestos de Master mix y agua, en lugar del ADN extraído de la sangre. El ciclo de cuantificación (Cq) obtenido para el NTC, en cada experimento, se consideró como ausencia de ADN para extrapolar en la cuantificación de las

muestra. La menor concentración a la que se detectó presencia de ADN por encima del Cq del NTC definió el límite de detección de la técnica para cada batería.

Para las otras técnicas el límite se estableció a la menor concentración de cada bacteria en la que se detectaba crecimiento de esa bacteria.

## 2.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa IBM® SPSS® Statistics 19.0.

Se analizó la prevalencia de bacteriemia como presencia/ausencia de bacterias en forma de variable categórica respecto a todos los experimentos realizados.

Se definió el límite de detección de cada técnica y para cada bacteria, como el valor de la menor concentración de sangre a la que es posible detectar presencia o ADN de la bacteria inoculada.

La correlación entre la cantidad de bacterias (variable cuantitativa continua) detectada con cada una de las tres técnicas capaces de cuantificar (cultivo, lisis-centrifugación y qPCR), se comparó con la de la técnica de referencia (PBS) mediante el coeficiente de correlación intraclase (ICC). Dado que la medida requiere de una variable cuantitativa continua, las muestras que dieron valor indeterminado al ser analizadas con qPCR fueron excluidas. La interpretación del valor de ICC se realizó de la siguiente manera: <0,4 pobre concordancia entre datos, entre 0,4 y 0,75 aceptable, >0,75 excelente.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Descripción general de los experimentos.

En total, participaron nueve sujetos en este estudio, por tanto, se realizaron nueve experimentos; tres con cada bacteria.

El número total de muestras analizadas fue 27, sin embargo, al ser analizadas mediante qPCR, 13 de ellas dieron un valor de ciclo menor que el obtenido con el NTC, es decir por debajo de límite de detección (<LD).

Los resultados de la concentración (UFC/ml) y tipo de bacterias inoculadas en sangre en cada sujeto detectadas con cada una de las cuatro técnicas figuran en la Tabla 3.

*Tabla 3.* Concentración de bacterias en UFC/ml de sangre inoculadas en cada muestra y detectadas con cada técnica.

Concentración referencia	Técnica análisis			
	Cultivo	Lisis-Cent	qPCR	BACTEC
<i>A. actinomycetemcomitans</i>				
$1,54 \times 10^4$	$6,43 \times 10^3$	$1,99 \times 10^3$	$9,16 \times 10^4$	Aa
$1,40 \times 10^4$	$3,03 \times 10^3$	$1,67 \times 10^3$	$1,44 \times 10^4$	Aa
$9,40 \times 10^3$	$4,90 \times 10^3$	$1,70 \times 10^3$	$1,71 \times 10^4$	Aa
$2,70 \times 10^2$	$1,00 \times 10^2$	$3,26 \times 10^1$	$2,10 \times 10^2$	Aa
$1,60 \times 10^2$	$1,17 \times 10^2$	$2,62 \times 10^1$	<LD	Aa
$9,00 \times 10^1$	$9,80 \times 10^1$	$2,92 \times 10^1$	$1,90 \times 10^1$	Aa
$2,00 \times 10^1$	$1,30 \times 10^1$	$4,00 \times 10^0$	<LD	Aa
$2,00 \times 10^1$	$1,20 \times 10^1$	$3,20 \times 10^0$	<LD	Aa
0	$7,00 \times 10^0$	$3,20 \times 10^0$	<LD	Aa
<i>P. gingivalis</i>				
$4,60 \times 10^3$	$2,70 \times 10^1$	$9,92 \times 10^2$	$3,60 \times 10^3$	Sa
$4,20 \times 10^3$	$2,47 \times 10^3$	$1,22 \times 10^3$	$1,80 \times 10^3$	-

Tabla 3. Concentración de bacterias en UFC/ml de sangre inoculadas en cada muestra y detectadas con cada técnica.

Concentración referencia	Técnica análisis			
	Cultivo	Lisis-Cent	qPCR	BACTEC
<i>P. gingivalis</i>				
2,20 x 10 <sup>3</sup>	3,55 x 10 <sup>2</sup>	0	2,06 x 10 <sup>3</sup>	-
6,00 x 10 <sup>1</sup>	4,23 x 10 <sup>2</sup>	3,28 x 10 <sup>1</sup>	7,10 x 10 <sup>2</sup>	Sa
1,00 x 10 <sup>1</sup>	1,40 x 10 <sup>1</sup>	0	2,09 x 10 <sup>2</sup>	-
1,00 x 10 <sup>1</sup>	0	4,00 x 10 <sup>1</sup>	3,70 x 10 <sup>2</sup>	-
0	1,00 x 10 <sup>0</sup>	0	<LD	-
0	0	2,00 x 10 <sup>0</sup>	<LD	Pa
0	0	0	<LD	Pm
<i>S. oralis</i>				
2,50 x 10 <sup>4</sup>	6,14 x 10 <sup>2</sup>	6,74 x 10 <sup>2</sup>	2,00 x 10 <sup>5</sup>	So
1,10 x 10 <sup>4</sup>	2,99 x 10 <sup>3</sup>	2,54 x 10 <sup>3</sup>	1,90 x 10 <sup>4</sup>	So y Sc-
1,03 x 10 <sup>4</sup>	2,96 x 10 <sup>3</sup>	2,34 x 10 <sup>3</sup>	4,36 x 10 <sup>3</sup>	So
5,60 x 10 <sup>2</sup>	1,44 x 10 <sup>2</sup>	1,02 x 10 <sup>2</sup>	<LD	So
1,00 x 10 <sup>2</sup>	4,70 x 10 <sup>1</sup>	2,44 x 10 <sup>1</sup>	<LD	Roto
8,00 x 10 <sup>1</sup>	4,60 x 10 <sup>1</sup>	4,62 x 10 <sup>1</sup>	<LD	So
1,20 x 10 <sup>1</sup>	2,50 x 10 <sup>1</sup>	2,02 x 10 <sup>1</sup>	<LD	So
1,00 x 10 <sup>1</sup>	1,00 x 10 <sup>0</sup>	4,20 x 10 <sup>0</sup>	<LD	So
1,00 x 10 <sup>1</sup>	1,00 x 10 <sup>0</sup>	2,40 x 10 <sup>0</sup>	<LD	Sa

<LD = Por debajo del límite de detección; - = Sin crecimiento; Aa = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Sa = *Staphylococcus aureus*; Pa = *Propionibacterium acnes*; Pm = *Prevotella melaninogenica*; So = *Streptococcus oralis*; Sc- = *Staphylococcus coagulasa negativo*.

### 3.2 Límite de detección, prevalencia, sensibilidad y especificidad

El límite de detección (Tabla 4) con cultivo directo y lisis-centrifugación fue de  $10^1$  UFC/ml para las tres bacterias. El sistema BACTEC alcanzó a detectar la presencia de *S. oralis* y de *A. actinomycetemcomitans* a una concentración de  $10^1$  UFC/ml, sin embargo no fue capaz de detectar la presencia de *P. gingivalis* a ninguna de las tres concentraciones estudiadas. En cuanto a la qPCR los niveles de detección fueron  $10^1$  UFC/ml para *P. gingivalis*,  $10^2$  UFC/ml para *A. actinomycetemcomitans* y  $10^4$  UFC/ml para *S. oralis*.

La prevalencia de bacteriemia detectada fue de 85,19% analizando las muestras mediante la técnica de referencia, 88,89% con cultivo directo, 85,19% con lisis-centrifugación, 51,85% utilizando qPCR y 59,26% con BACTEC (Tabla 4).

La técnica más sensible fue el cultivo directo, mientras que la más específica con un 100% fue la qPCR (Tabla 4)

Tabla 4. Prevalencia, límite de detección, sensibilidad y especificidad

Técnica	Límite de detección (UFC/ml)	Prevalencia	Sensibilidad	Especificidad
Referencia	$10^1$	85,19%		
Cultivo directo	$10^1$	88,89%	95,65%	50,00%
Lisis-centrifugación	$10^1$	85,19%	91,30%	50,00%
qPCR	<i>Aa</i> $10^2$	51,85%	60,87%	100%
	<i>Pg</i> $10^1$			
	<i>So</i> $10^4$			
BACTEC	<i>Aa</i> $10^1$	59,26%	65,22%	75,00%
	<i>Pg</i> -			
	<i>So</i> $10^1$			

*Aa* = *A. actinomycetemcomitans*; *Pg* = *P. gingivalis*; *So* = *S. oralis*; - = no detecta a ninguna concentración



### 3.3 Correlación con la técnica de referencia

En cuanto a la correlación entre la técnica de referencia y las tres técnicas capaces de cuantificar (cultivo, lisis-centrifugación y qPCR), analizando globalmente todas las concentraciones, se observó que todas las técnicas para todas las bacterias tienen una pobre correlación, excepto cultivo para *A. actinomycetemcomitans* (Tabla 5). En el análisis por concentraciones (Anexo 2) se encontró que en el caso de *S. oralis* a las tres concentraciones estudiadas, la correlación fue pobre. Asimismo, para  $10^4$  UFC/ml la correlación fue baja con las tres técnicas y para las tres bacterias. En cambio, el cultivo directo presenta una correlación casi perfecta con la técnica de referencia a concentraciones de  $10^2$  y  $10^1$  UFC/ml.

Tabla 5. Media, desviación estándar y coeficiente de correlación intraclase.

Bact	Técnica	n	Media (UFC/ml)	SD (UFC/ml)	ICC	95% IC	F	p
Global	Referencia	27	$3.61 \times 10^3$	$6.40 \times 10^3$				
	Cultivo	27	$9.19 \times 10^2$	$1.71 \times 10^3$	0.289	-0.050; 0.584	6.64	0.0160
	Lisis-C	27	$4.98 \times 10^2$	$8.27 \times 10^2$	0.154	-0.156; 0.467	7.703	0.010
	qPCR	20	$1.86 \times 10^4$	$4.73 \times 10^4$	0.231	-0.192; 0.595	2.178	0.156
Aa	Referencia	9	$4.37 \times 10^3$	$6.61 \times 10^3$				
	Cultivo	9	$1.63 \times 10^3$	$2.51 \times 10^3$	0.556	-0.026; 0.874	3.518	0.098
	Lisis-C	9	$6.06 \times 10^2$	$8.90 \times 10^2$	0.210	-0.286; 0.709	3.877	0.084
	qPCR	5	$2.46 \times 10^4$	$3.83 \times 10^4$	0.256	-0.589; 0.879	1.268	0.323
Pg	Referencia	9	$1.23 \times 10^3$	$1.94 \times 10^3$				
	Cultivo	9	$3.66 \times 10^2$	$8.07 \times 10^2$	0.373	-0.216; 0.801	2.606	0.145
	Lisis-C	9	$2.50 \times 10^2$	$4.89 \times 10^2$	0.368	-0.185; 0.794	3.838	0.086
	qPCR	7	$1.17 \times 10^3$	$1.36 \times 10^3$	0.840	0.388; 0.970	1.221	0.312
So	Referencia	9	$5.23 \times 10^3$	$8.70 \times 10^3$				
	Cultivo	9	$7.59 \times 10^2$	$1.27 \times 10^3$	0.120	-0.402; 0.668	2.701	0.139
	Lisis-C	9	$6.39 \times 10^2$	$1.04 \times 10^3$	0.107	-0.403; 0.659	2.825	0.131
	qPCR	8	$3.01 \times 10^4$	$6.89 \times 10^4$	0.222	-0.470; 0.768	1.255	0.300

UFC = unidades formadoras de colonia; Bact = Bacteria; SD = desviación estándar; ICC = coeficiente correlación intraclase; IC = intervalo de confianza.

Aa = *A. actinomycetemcomitans*; Pg = *P. gingivalis* So = *S. oralis*.

## 4. DISCUSIÓN

El presente estudio pretende investigar la calidad de cuatro técnicas de análisis microbiológico para detectar patógenos periodontales en sangre, en cuanto a correlación con una técnica de referencia (cultivo de PBS), límite de detección, sensibilidad y especificidad, e identificar la técnica de elección. El cultivo directo fue la técnica con mayor sensibilidad y correlación con el cultivo de PBS y menor límite de detección. En cambio, la qPCR alcanzó un 100% de especificidad.

Hasta ahora se han realizado estudios sobre bacteriemias en los que comparaban distintas técnicas de análisis, sin embargo, ninguno de ellos utilizaba una técnica de referencia, por lo que no se trataban de verdaderos ensayos de validación dificultando la comparación con la presente investigación. Además este es el primer ensayo que contrasta cuatro técnicas, entre ellas las tres más utilizadas en la literatura de bacteriemias orales.

El hemocultivo-**BACTEC** es el sistema más utilizados a nivel hospitalario para la detección de bacteriemias y también en los artículos sobre bacteriemias orales (Kinane et al., 2005), sin embargo, esta técnica no ha sido validada para la detección de patógenos periodontales. Los resultados obtenidos en este estudio *in vitro* de validación indican que el BACTEC no es capaz de detectar e identificar la presencia en sangre de *P. gingivalis* a ninguna de las concentraciones investigadas. La presencia de periodontopatógenos en sangre está muy asociada a la presencia de *P. gingivalis* (Castillo et al., 2011) y este microorganismo también es el que más frecuentemente se asocia a enfermedad cardiovascular (Gaetti-Jardim et al., 2009). Por ello, es esencial que las técnicas empleadas sean capaces de detectar dicha bacteria. Además, esta técnica es costosa, no permite cuantificar, precisa del envío de las muestras a algún laboratorio especializado y es más lenta que las demás, ya que requiere de 14 días de incubación en las botellas más el tiempo de cultivo posterior de las muestras positivas para su identificación. Por todo ello parece poco recomendable su uso en este tipo de estudios.

La **lisis-centrifugación** es un método sensible y preciso para el análisis de bacteriemias orales, que permite analizar magnitudes. Esta técnica es la que ofrece, después del cultivo directo mejores resultados. Esto coincide con el estudio de Lucas y cols. que encontraron que la lisis-filtración era más sensible que BACTEC (Lucas et al., 2002), aunque contradice lo publicado previamente por Hutchinson y cols (Hutchinson et al., 1992a). Sin embargo, ambos métodos requieren pasos posteriores para la identificación de las bacterias, alargando y encareciendo el proceso y aumentando el riesgo de contaminación.

La **PCR** está considerada como una técnica extremadamente sensible, es capaz de detectar bacterias muertas y requiere menos tiempo de procesado que las otras técnicas (Sanz et al., 2004), obteniendo resultados en unas horas. Por el contrario, se pueden presentar dificultades al estudiar pequeñas cantidades de ADN, la especificidad no es tan alta, viéndose afectada por diferentes factores, y el precio del equipo es elevado (Sanz et al., 2004). La variante cuantitativa de PCR utilizada en este estudio (qPCR) permite cuantificar y resuelve el problema de especificidad (Doungudomdacha et al., 2001).

A pesar de que la PCR es una técnica capaz de detectar hasta una única copia de ADN (Greenstein, 1988), en este estudio la prevalencia de bacteriemia detectada fue muy baja, lo que sucede también en otros estudios (Savarrio et al., 2005). Esto puede deberse al bajo número de experimentos realizados, al pequeño volumen de sangre utilizado que dificultaría captar la presencia de bacterias cuando se encuentran a baja concentración, o a cierta contaminación al procesar las muestras en el laboratorio, que elevan el umbral de detección. A pesar de los resultados obtenidos en este estudio, las prometedoras posibilidades de esta técnica, exigen que se continúe investigando esta vía para así mejorar los problemas que pueda presentar actualmente.

Hasta ahora ningún estudio de bacteriemias orales ha utilizado el **cultivo directo** en medios generales, a pesar de ser el método de referencia para detectar patógenos periodontales en muestras subgingivales. Esta técnica permite un recuento absoluto y relativo de las bacterias, es sencilla y de bajo costo. Entre sus

limitaciones encontramos: la necesidad de que las bacterias estén vivas (precisando estrictas medidas para el transporte y conservación de las muestras), la posibilidad de competencia entre bacterias y el hecho de que alrededor de un 50% de los microorganismos subgingivales no son cultivables (Sanz et al., 2004). Esta técnica obtiene los mejores resultados en cuanto a ICC de las cuatro técnicas comparadas. Según dichos resultados el cultivo directo es la técnica de elección para detección de patógenos periodontales en sangre, por ser la más sensible, precisa, sencilla y menos costosa de las cuatro. Estos resultados son similares a los obtenidos por Castillo y cols. (Castillo et al., 2011) y Savarrio y cols. (Savarrio et al., 2005) al comparar PCR con técnicas de cultivo, aunque ellos emplearon para el cultivo medios líquidos enriquecidos que favorecen el crecimiento bacteriano y por tanto no permiten la cuantificación. Sin embargo, Kinane y cols. (Kinane et al., 2005) obtuvieron mejores resultados con PCR.

En cuanto a la magnitud de las bacteriemias, otros estudios *in vivo* obtuvieron resultados entre 0,12 UFC/ml (Heimdahl et al., 1990) y 50,5 UFC/ml (Zhang et al., 2013). En este estudio se simularon bacteriemias a diferentes concentraciones entre  $10^1$  y  $10^4$  UCF/ml. El cultivo directo y la lisis-centrifugación fueron las técnicas con más bajos umbrales de detección, siendo capaces de detectar la presencia e identificar adecuadamente las tres bacterias estudiadas a concentraciones del orden de  $10^1$  UCF/ml.

La principal limitación de este estudio es el bajo número de experimentos realizado con cada bacteria, por ello los resultados obtenidos no alcanzan el nivel de significación estadística y no son concluyentes. Sin embargo, la tendencia que se observa a favor del cultivo directo y en contra de BACTEC son claras. Sería necesario realizar un estudio con mayor número de muestras y experimentos para poder desaconsejar concluyentemente el uso del BACTEC en este tipo de investigaciones.

## 5. CONCLUSIONES

Considerando las limitaciones del presente estudio, se rechaza la hipótesis de que la PCR cuantitativa sea la técnica de elección para el análisis de bacteriemias orales, aunque por sus prometedoras posibilidades es recomendable seguir investigando esta técnica y así mejorarla.

Además, se puede concluir que el cultivo directo es la mejor de las cuatro técnicas en cuanto a sensibilidad, precisión y umbral de detección para el análisis de bacteriemias mono-especie de *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* y *Streptococcus oralis*.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1996. Consensus Report Periodontal Diseases: Pathogenesis and Microbial Factors. *Annals of Periodontology*, 1, 926-932.
- ALSINA, M., OLLE, E. & FRIAS, J. 2001. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol*, 39, 509-13.
- ALWAN, A. 2011. *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, World Health Organization.
- ARMITAGE, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4, 1-6.
- ASI, K. S., GILL, A. S. & MAHAJAN, S. 2010. Postoperative bacteremia in periodontal flap surgery, with and without prophylactic antibiotic administration: A comparative study. *J Indian Soc Periodontol*, 14, 18-22.
- BAHRANI-MOUGEOT, F. K., PASTER, B. J., COLEMAN, S., ASHAR, J., BARBUTO, S. & LOCKHART, P. B. 2008. Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. *J Clin Microbiol*, 46, 2129-32.
- BASCONES-MARTINEZ, A., MUNOZ-CORCUERA, M. & MEURMAN, J. H. 2009. Odontogenic infections in the etiology of infective endocarditis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 9, 231-5.
- BECK, J. D. & OFFENBACHER, S. 2001. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: a state-of-the-science review. *Ann Periodontol*, 6, 9-15.
- BERGSTROM, J. 2006. Periodontitis and smoking: an evidence-based appraisal. *J Evid Based Dent Pract*, 6, 33-41.
- BHANJI, S., WILLIAMS, B., SELLER, B., ELWOOD, T. & MANCL, L. 2002. Transient bacteremia induced by toothbrushing a comparison of the Sonicare toothbrush with a conventional toothbrush. *Pediatr Dent*, 24, 295-9.
- BOGGESE, K. A., BECK, J. D., MURTHA, A. P., MOSS, K. & OFFENBACHER, S. 2006. Maternal periodontal disease in early pregnancy and risk for a small-for-gestational-age infant. *Am J Obstet Gynecol*, 194, 1316-22.

- BOLUKBASI, N., OZDEMIR, T., OKSUZ, L. & GURLER, N. 2012. Bacteremia following dental implant surgery: preliminary results. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 17, e69-75.
- BORGNAKKE, W. S., YLOSTALO, P. V., TAYLOR, G. W. & GENCO, R. J. 2013. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *J Periodontol*, 84, S135-52.
- BOUCHARD, P., BOUTOUYRIE, P., D'AIUTO, F., DEANFIELD, J., DELIARGYRIS, E., FERNANDEZ-AVILÉS, F., HUGHES, F., MADIANOS, P., RENVERT, S. & SANZ, M. 2010. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease consensus document. *European Heart Journal Supplements*, 12, B13-B22.
- BOUTAGA, K., VAN WINKELHOFF, A. J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. & SAVELKOUL, P. H. 2003. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Clin Microbiol*, 41, 4950-4.
- BOUTAGA, K., VAN WINKELHOFF, A. J., VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. & SAVELKOUL, P. H. 2005. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 45, 191-9.
- CAIRO, F., GAETA, C., DORIGO, W., OGGIONI, M. R., PRATESI, C., PINI PRATO, G. P. & POZZI, G. 2004. Periodontal pathogens in atheromatous plaques. A controlled clinical and laboratory trial. *J Periodontal Res*, 39, 442-6.
- CARMONA, I. T., DIZ DIOS, P. & SCULLY, C. 2002. An update on the controversies in bacterial endocarditis of oral origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 93, 660-70.
- CASTILLO, D. M., SANCHEZ-BELTRAN, M. C., CASTELLANOS, J. E., SANZ, I., MAYORGA-FAYAD, I., SANZ, M. & LAFAURIE, G. I. 2011. Detection of specific periodontal microorganisms from bacteraemia samples after periodontal therapy using molecular-based diagnostics. *J Clin Periodontol*, 38, 418-27.
- CHAPPLE, I. L. & GENCO, R. 2013. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 84, S106-12.

- CHERRY, M., DALY, C. G., MITCHELL, D. & HIGHFIELD, J. 2007. Effect of rinsing with povidone-iodine on bacteraemia due to scaling: a randomized-controlled trial. *J Clin Periodontol*, 34, 148-55.
- CHIU, B. 1999. Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques. *Am Heart J*, 138, S534-6.
- CHOI, E. K., PARK, S. A., OH, W. M., KANG, H. C., KURAMITSU, H. K., KIM, B. G. & KANG, I. C. 2005. Mechanisms of Porphyromonas gingivalis-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in endothelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 44, 51-8.
- COBE, H. M. 1954. Transitory bacteremia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 7, 609-15.
- CRATA, K., DALY, C. G., MITCHELL, D., CURTIS, B., STEWART, D. & HEITZMAYFIELD, L. J. 2009. Bacteraemia due to dental flossing. *J Clin Periodontol*, 36, 323-32.
- DALY, C., MITCHELL, D., GROSSBERG, D., HIGHFIELD, J. & STEWART, D. 1997. Bacteraemia caused by periodontal probing. *Aust Dent J*, 42, 77-80.
- DALY, C. G., MITCHELL, D. H., HIGHFIELD, J. E., GROSSBERG, D. E. & STEWART, D. 2001. Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation. *J Periodontol*, 72, 210-4.
- DIZ DIOS, P., TOMAS CARMONA, I., LIMERES POSSE, J., MEDINA HENRIQUEZ, J., FERNANDEZ FEIJOO, J. & ALVAREZ FERNANDEZ, M. 2006. Comparative efficacies of amoxicillin, clindamycin, and moxifloxacin in prevention of bacteremia following dental extractions. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 2996-3002.
- DORN, G. & SMITH, K. 1978. New centrifugation blood culture device. *Journal of clinical microbiology*, 7, 52-54.
- DOUNGUDOMDACHA, S., RAWLINSON, A., WALSH, T. F. & DOUGLAS, C. W. 2001. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Actinobacillus actinomycetemcomitans at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol*, 28, 437-45.



- DZINK, J. L., TANNER, A. C., HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSKY, S. S. 1985. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *J Clin Periodontol*, 12, 648-59.
- ELKAIM, R., DAHAN, M., KOCGOZLU, L., WERNER, S., KANTER, D., KRETZ, J. G. & TENENBAUM, H. 2008. Prevalence of periodontal pathogens in subgingival lesions, atherosclerotic plaques and healthy blood vessels: a preliminary study. *J Periodontal Res*, 43, 224-31.
- ENGEBRETSON, S. & KOCHER, T. 2013. Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, 84, S153-69.
- FIGUERO, E., LINDAHL, C., MARIN, M. J., RENVERT, S., HERRERA, D., OHLSSON, O., WETTERLING, T. & SANZ, M. 2014. Quantification of Periodontal Pathogens in Vascular, Blood and Subgingival Samples from Patients with Peripheral Arterial Disease or Abdominal Aortic Aneurysms. *J Periodontol*.
- FIGUERO, E., SÁNCHEZ-BELTRÁN, M., CUESTA-FRECHOSO, S., TEJERINA, J. M., DEL CASTRO, J. A., GUTIÉRREZ, J. M., HERRERA, D. & SANZ, M. 2011. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaque by nested polymerase chain reaction. *Journal Of Periodontology*, 82, 1469-1477.
- FINE, D. H., FURGANG, D., MCKIERNAN, M., TERESKI-BISCHIO, D., RICCI-NITTEL, D., ZHANG, P. & ARAUJO, M. W. 2010. An investigation of the effect of an essential oil mouthrinse on induced bacteraemia: a pilot study. *J Clin Periodontol*, 37, 840-7.
- FORNER, L., LARSEN, T., KILIAN, M. & HOLMSTRUP, P. 2006. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol*, 33, 401-7.
- GAETTI-JARDIM, E., JR., MARCELINO, S. L., FEITOSA, A. C., ROMITO, G. A. & AVILA-CAMPOS, M. J. 2009. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J Med Microbiol*, 58, 1568-75.
- GIACONA, M. B., PAPAPANOU, P. N., LAMSTER, I. B., RONG, L. L., D'AGATI, V. D., SCHMIDT, A. M. & LALLA, E. 2004. Porphyromonas gingivalis induces its

- uptake by human macrophages and promotes foam cell formation in vitro. *FEMS Microbiol Lett*, 241, 95-101.
- GIGLIO, J. A., ROWLAND, R. W., DALTON, H. P. & LASKIN, D. M. 1992. Suture removal-induced bacteremia: a possible endocarditis risk. *J Am Dent Assoc*, 123, 65-6, 69-70.
- GREENSTEIN, G. 1988. Microbiologic assessments to enhance periodontal diagnosis. *J Periodontol*, 59, 508-15.
- HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSKY, S. S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 5, 78-111.
- HARTZELL, J. D. 2005. Incidence of bacteremia after routine tooth brushing. *The American journal of the medical sciences*, 329, 178-80.
- HEIMDAHL, A., HALL, G., HEDBERG, M., SANDBERG, H., SODER, P. O., TUNER, K. & NORD, C. E. 1990. Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *J Clin Microbiol*, 28, 2205-9.
- HUJOEL, P. P., DRANGSHOLT, M., SPIEKERMAN, C. & DEROUEN, T. A. 2002. Periodontitis-systemic disease associations in the presence of smoking--causal or coincidental? *Periodontol 2000*, 30, 51-60.
- HUTCHINSON, N. A., SHANSON, D. C. & MALINS, T. 1992a. Clinical comparison of Sentinel, a novel blood culture system, with radiometric Bactec 460 and Isolator 10 in the detection of streptococcal and anaerobic bacteraemias. *J Clin Pathol*, 45, 475-8.
- HUTCHINSON, N. A., THOMAS, F. D. & SHANSON, D. C. 1992b. The clinical comparison of Oxoid Signal with Bactec blood culture systems for the detection of streptococcal and anaerobic bacteraemias. *J Med Microbiol*, 37, 410-2.
- IDE, M. & PAPAPANOU, P. N. 2013. Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review. *J Clin Periodontol*, 40 Suppl 14, S181-94.
- JONES, D. J., MUNRO, C. L., GRAP, M. J., KITTEN, T. & EDMOND, M. 2010. Oral care and bacteremia risk in mechanically ventilated adults. *Heart Lung*, 39, S57-65.

- KHADER, Y. S., DAUOD, A. S., EL-QADERI, S. S., ALKAFAJEI, A. & BATAYHA, W. Q. 2006. Periodontal status of diabetics compared with nondiabetics: a meta-analysis. *J Diabetes Complications*, 20, 59-68.
- KIGURE, T., SAITO, A., SEIDA, K., YAMADA, S., ISHIHARA, K. & OKUDA, K. 1995. Distribution of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodontol Res*, 30, 332-41.
- KINANE, D. F., RIGGIO, M. P., WALKER, K. F., MACKENZIE, D. & SHEARER, B. 2005. Bacteraemia following periodontal procedures. *J Clin Periodontol*, 32, 708-13.
- KING, R. C., CRAWFORD, J. J. & SMALL, E. W. 1988. Bacteremia following intraoral suture removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 65, 23-8.
- KORNMAN, K. S. 2008. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*, 79, 1560-8.
- LAFaurIE, G. I., MAYORGA-FAYAD, I., TORRES, M. F., CASTILLO, D. M., AYA, M. R., BARON, A. & HURTADO, P. A. 2007. Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, 34, 873-9.
- LINEBERGER, L. T. & DE MARCO, T. J. 1973. Evaluation of transient bacteremia following routine periodontal procedures. *J Periodontol*, 44, 757-62.
- LISTGARTEN, M. A. 1988. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 15, 485-7.
- LISTGARTEN, M. A. & SOCRANSKY, S. S. 1964. ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTICS OF A SPIROCHETE IN THE LESION OF ACUTE NECROTIZING ULCERATIVE GINGIVOSTOMATITIS (VINCENT'S INFECTION). *Arch Oral Biol*, 9, 95-6.
- LLODRA-CALVO, J. 2012. Encuesta de Salud Oral en España 2010. *RCOE*, 17, 13-41.
- LOCKHART, P. B., BRENNAN, M. T., THORNHILL, M., MICHALOWICZ, B. S., NOLL, J., BAHRANI-MOUGEOT, F. K. & SASSER, H. C. 2009. Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis-related bacteremia. *J Am Dent Assoc*, 140, 1238-44.
- LOE, H. 1983. Principles of aetiology and pathogenesis governing the treatment of periodontal disease. *Int Dent J*, 33, 119-26.

- LOE, H., THEILADE, E. & JENSEN, S. B. 1965. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *J Periodontol*, 36, 177-87.
- LOFTHUS, J. E., WAKI, M. Y., JOLKOVSKY, D. L., OTOMO-CORGEL, J., NEWMAN, M. G., FLEMMIG, T. & NACHNANI, S. 1991. Bacteremia following subgingival irrigation and scaling and root planing. *J Periodontol*, 62, 602-7.
- LOZA-FERNÁNDEZ, E., PLANES, A. & RODRÍGUEZ, M. 2003. Hemocultivos In: CERCENADO, E. & CANTÓN, R. (eds.) *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- LUCAS, V. S., GAFAN, G., DEWHURST, S. & ROBERTS, G. J. 2008. Prevalence, intensity and nature of bacteraemia after toothbrushing. *J Dent*, 36, 481-7.
- LUCAS, V. S., LYTRA, V., HASSAN, T., TATHAM, H., WILSON, M. & ROBERTS, G. J. 2002. Comparison of lysis filtration and an automated blood culture system (BACTEC) for detection, quantification, and identification of odontogenic bacteremia in children. *J Clin Microbiol*, 40, 3416-20.
- MADIANOS, P. N., BOBETSIS, Y. A. & OFFENBACHER, S. 2013. Adverse pregnancy outcomes (APOs) and periodontal disease: pathogenic mechanisms. *J Periodontol*, 84, S170-80.
- MAESTRE, J. R., MATEO, M. & SANCHEZ, P. 2008. [Bacteremia after periodontal procedures]. *Rev Esp Quimioter*, 21, 153-6.
- MAHARAJ, B., COOVADIA, Y. & VAYEJ, A. C. 2012. An investigation of the frequency of bacteraemia following dental extraction, tooth brushing and chewing. *Cardiovasc J Afr*, 23, 340-4.
- MATTILA, K. J., NIEMINEN, M. S., VALTONEN, V. V., RASI, V. P., KESANIEMI, Y. A., SYRJALA, S. L., JUNGELL, P. S., ISOLUOMA, M., HIETANIEMI, K. & JOKINEN, M. J. 1989. Association between dental health and acute myocardial infarction. *Bmj*, 298, 779-81.
- MIYAKAWA, H., HONMA, K., QI, M. & KURAMITSU, H. K. 2004. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with low-density lipoproteins: implications for a role for periodontitis in atherosclerosis. *J Periodontal Res*, 39, 1-9.

- MOORE, W. E., HOLDEMAN, L. V., CATO, E. P., SMIBERT, R. M., BURMEISTER, J. A. & RANNEY, R. R. 1983. Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect Immun*, 42, 510-5.
- MOORE, W. E. & MOORE, L. V. 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 5, 66-77.
- MOROZUMI, T., KUBOTA, T., ABE, D., SHIMIZU, T., KOMATSU, Y. & YOSHIE, H. 2010. Effects of irrigation with an antiseptic and oral administration of azithromycin on bacteremia caused by scaling and root planing. *J Periodontol*, 81, 1555-63.
- MURPHY, A. M., DALY, C. G., MITCHELL, D. H., STEWART, D. & CURTIS, B. H. 2006. Chewing fails to induce oral bacteraemia in patients with periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 33, 730-6.
- NETZER, R. O., ZOLLINGER, E., SEILER, C. & CERNY, A. 2000. Infective endocarditis: clinical spectrum, presentation and outcome. An analysis of 212 cases 1980-1995. *Heart*, 84, 25-30.
- NICU, E. A., VAN DER VELDEN, U., NIEUWLAND, R., EVERTS, V. & LOOS, B. G. 2009. Elevated platelet and leukocyte response to oral bacteria in periodontitis. *J Thromb Haemost*, 7, 162-70.
- NISENGARD, R. 1987. Bacterial Invasion in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 58, 331-339.
- NYVAD, B. & KILIAN, M. 1987. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res*, 95, 369-80.
- OFFENBACHER, S., KATZ, V., FERTIK, G., COLLINS, J., BOYD, D., MAYNOR, G., MCKAIG, R. & BECK, J. 1996. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol*, 67, 1103-13.
- PAPAPANOU, P. N., NEIDERUD, A. M., PAPADIMITRIOU, A., SANDROS, J. & DAHLEN, G. 2000. "Checkerboard" assessments of periodontal microbiota and serum antibody responses: a case-control study. *J Periodontol*, 71, 885-97.
- PARAHITIYAWA, N. B., JIN, L. J., LEUNG, W. K., YAM, W. C. & SAMARANAYAKE, L. P. 2009. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev*, 22, 46-64, Table of Contents.

- PASTER, B. J., OLSEN, I., AAS, J. A. & DEWHIRST, F. E. 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000, 42, 80-7.
- PEREZ-CHAPARRO, P. J., LAFAURIE, G. I., GRACIEUX, P., MEURIC, V., TAMANAI-SHACOORI, Z., CASTELLANOS, J. E. & BONNAURE-MALLET, M. 2009. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in isolates from subgingival plaque and blood sample during bacteremia. *Biomedica*, 29, 298-306.
- PINEIRO, A., TOMAS, I., BLANCO, J., ALVAREZ, M., SEOANE, J. & DIZ, P. 2010. Bacteraemia following dental implants' placement. *Clin Oral Implants Res*, 21, 913-8.
- RAJASUO, A., PERKKI, K., NYFORS, S., JOUSIMIES-SOMER, H. & MEURMAN, J. H. 2004. Bacteremia following surgical dental extraction with an emphasis on anaerobic strains. *J Dent Res*, 83, 170-4.
- REYES, L., HERRERA, D., KOZAROV, E., ROLDA, S. & PROGULSKE-FOX, A. 2013. Periodontal bacterial invasion and infection: contribution to atherosclerotic pathology. *J Periodontol*, 84, S30-50.
- ROBERTS, G. J. 1999. Dentists are innocent! "Everyday" bacteremia is the real culprit: a review and assessment of the evidence that dental surgical procedures are a principal cause of bacterial endocarditis in children. *Pediatr Cardiol*, 20, 317-25.
- ROBERTS, G. J., HOLZEL, H. S., SURY, M. R., SIMMONS, N. A., GARDNER, P. & LONGHURST, P. 1997. Dental bacteremia in children. *Pediatr Cardiol*, 18, 24-7.
- SANCHEZ, M. C., MARIN, M. J., FIGUERO, E., LLAMA-PALACIOS, A., LEON, R., BLANC, V., HERRERA, D. & SANZ, M. 2014. Quantitative real-time PCR combined with propidium monoazide for the selective quantification of viable periodontal pathogens in an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodontal Res*, 49, 20-8.
- SANDRE, R. M. & SHAFRAN, S. D. 1996. Infective endocarditis: review of 135 cases over 9 years. *Clin Infect Dis*, 22, 276-86.

- SANZ, M. & KORNMAN, K. 2013. Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 84, S164-9.
- SANZ, M., LAU, L., HERRERA, D., MORILLO, J. M. & SILVA, A. 2004. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol*, 31, 1034-47.
- SANZ, M., VAN WINKELHOFF, A. J. & ON BEHALF OF WORKING GROUP 1 OF THE SEVENTH EUROPEAN WORKSHOP ON, P. 2011. Periodontal infections: understanding the complexity – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 38, 3-6.
- SAVARRIO, L., MACKENZIE, D., RIGGIO, M., SAUNDERS, W. P. & BAGG, J. 2005. Detection of bacteraemias during non-surgical root canal treatment. *J Dent*, 33, 293-303.
- SCHAEFER, A. S., RICHTER, G. M., GROESSNER-SCHREIBER, B., NOACK, B., NOTHNAGEL, M., EL MOKHTARI, N. E., LOOS, B. G., JEPSEN, S. & SCHREIBER, S. 2009. Identification of a shared genetic susceptibility locus for coronary heart disease and periodontitis. *PLoS Genet*, 5, e1000378.
- SCHLEIN, R. A., KUDLICK, E. M., REINDORF, C. A., GREGORY, J. & ROYAL, G. C. 1991. Toothbrushing and transient bacteremia in patients undergoing orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 99, 466-72.
- SCONYERS, J. R., CRAWFORD, J. J. & MORIARTY, J. D. 1973. Relationship of bacteremia to toothbrushing in patients with periodontitis. *J Am Dent Assoc*, 87, 616-22.
- TANNER, A., KENT, R., MAIDEN, M. F. & TAUBMAN, M. A. 1996. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J Periodontal Res*, 31, 195-204.
- TANNER, A. C., HAFFER, C., BRATTHALL, G. T., VISCONTI, R. A. & SOCRANSKY, S. S. 1979. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*, 6, 278-307.

- TOMAS, I., ALVAREZ, M., LIMERES, J., POTEL, C., MEDINA, J. & DIZ, P. 2007a. Prevalence, duration and aetiology of bacteraemia following dental extractions. *Oral Dis*, 13, 56-62.
- TOMAS, I., ALVAREZ, M., LIMERES, J., TOMAS, M., MEDINA, J., OTERO, J. L. & DIZ, P. 2007b. Effect of a chlorhexidine mouthwash on the risk of postextraction bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 28, 577-82.
- TOMAS, I., PEREIRA, F., LLUCIAN, R., POVEDA, R., DIZ, P. & BAGAN, J. V. 2008. Prevalence of bacteraemia following third molar surgery. *Oral Dis*, 14, 89-94.
- TONETTI, M. S. & VAN DYKE, T. E. 2013. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*, 84, S24-9.
- TUOMAINEN, A. M., JAUHIAINEN, M., KOVANEN, P. T., METSO, J., PAJU, S. & PUSSINEN, P. J. 2008. Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces MMP-9 expression and proatherogenic lipoprotein profile in apoE-deficient mice. *Microb Pathog*, 44, 111-7.
- VAN DER VELDEN, U., VAROUFAKI, A., HUTTER, J. W., XU, L., TIMMERMAN, M. F., VAN WINKELHOFF, A. J. & LOOS, B. G. 2003. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. *J Clin Periodontol*, 30, 603-10.
- WAGHMARE, A. S., VHANMANE, P. B., SAVITHA, B., CHAWLA, R. L. & BAGDE, H. S. 2013. Bacteremia following scaling and root planing: A clinico-microbiological study. *J Indian Soc Periodontol*, 17, 725-30.
- ZHANG, W., DALY, C. G., MITCHELL, D. & CURTIS, B. 2013. Incidence and magnitude of bacteraemia caused by flossing and by scaling and root planing. *J Clin Periodontol*, 40, 41-52.



## ANEXO 1: Información y Consentimiento informado

**Universidad Complutense de Madrid**  
**Facultad de Odontología**



### HOJA DE INFORMACIÓN

**Estudio:** *Validación de cuatro técnicas para la detección y cuantificación de patógenos periodontales en sangre.*

**Investigadores:**

Mariano Sanz, David Herrera, Elena Figuera, M<sup>a</sup>José Marín, Susana Rubido, Pedro Diz, Maximiliano Álvarez.

**Centro de la Investigación:**

Estudio Clínico:

Clínica del Programa Máster de Periodoncia. Facultad de Odontología, Universidad Complutense, Madrid.

Estudio Microbiológico:

Servicio de Microbiología Oral y Biología Molecular. Facultad de Odontología, Universidad Complutense, Madrid (excepto BACTEC).

BACTEC: Departamento de Microbiología, Hospital Xeral Cíes, Vigo.

### INFORMACIÓN

Las periodontitis son un grupo de enfermedades de naturaleza infecciosa, caracterizadas por la destrucción del aparato de soporte del diente (periodonto). La principal consecuencia de las periodontitis, la pérdida de dientes, causa dificultades funcionales y estéticas; sin embargo, en los últimos años también se han asociado a problemas de salud sistémico.

El factor etiológico primario en las periodontitis es la presencia de bacterias específicas organizadas en forma de biofilm bajo la encía (subgingival). Debido a las características de las lesiones periodontales, las bacterias presentes en el biofilm subgingival, pueden pasar a la circulación sanguínea sistémica (bacteriemia). El paso de estas bacterias a sangre puede ser el posible nexo de unión que explique la asociación encontrada entre pacientes con periodontitis y determinadas enfermedades sistémicas, tales como enfermedades cardiovasculares.

Existen diferentes métodos para el análisis de las bacteriemias por bacterias relacionadas con periodontitis, por lo que es necesario realizar estudios de laboratorio con sangre de pacientes, que permiten encontrar la técnica de elección que se emplee en estudios clínicos posteriores. Para ello, se le pedirá que acuda a dos visitas. En la primera, se procederá al registro de medidas clínicas (profundidad de las bolsas periodontales) para conocer su situación periodontal, y en el caso de que se considere que se encuentra sano a nivel periodontal, se procederá a una segunda visita en la que se tomará una muestra de sangre (75ml) que será empleada para un estudio posterior en el laboratorio. Esta toma de muestras no supondrá ningún beneficio adicional para usted.

Para la realización del estudio es imprescindible mi colaboración con unas medidas de higiene y alimentación previas a la cita de muestras, siendo así que su omisión puede provocar resultados distintos a los esperados. A su vez, asumo no debo de tomar ningún antibiótico ni antiséptico que pueda influir en los resultados del estudio, a no ser que sea estrictamente necesario y prescrito por un facultativo. Cualquier duda que tenga, podrá ser resuelta por cualquiera de los miembros del equipo investigador.

Confidencialidad. Ninguna persona, excepto los investigadores, accederá a los datos recogidos. Cada persona tendrá asignado un número, y todos sus datos no tendrán otra identificación que ese número, cuyas claves solo tendrá el investigador principal. Todas las copias y datos se conservarán adecuadamente y con acceso limitado.

## HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Estudio:** *Validación de cuatro técnicas para la detección y cuantificación de patógenos periodontales en sangre.*

Yo, \_\_\_\_\_  
(NOMBRE Y APELLIDOS)

He recibido la hoja de información  
He podido hacer preguntas sobre el estudio  
He recibido respuesta satisfactoria a mis preguntas  
He recibido suficiente información sobre el estudio

He hablado con \_\_\_\_\_  
(NOMBRE Y APELLIDOS DEL INVESTIGADOR)

Comprendo que mi participación es voluntaria.  
Comprendo que puedo retirarme del estudio:  
1º Cuando quiera  
2º Sin tener que dar explicaciones  
3º Sin que esto repercuta en mis cuidados dentales.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

Firma del Participante

\_\_\_\_\_

## ANEXO 2: Tablas de resultados

*Media, desviación estándar y coeficiente de correlación intraclase por concentración teórica.*

UFC/ml teórica	Bact	Técnica	n	Media (UFC/ml)	SD (UFC/ml)	ICC	95% IC	F	p
10 <sup>1</sup>	Global	Referencia	9	1.80 x 10 <sup>1</sup>	2.81 x 10 <sup>1</sup>				
		Cultivo	9	1.68 x 10 <sup>1</sup>	3.16 x 10 <sup>1</sup>	0.969	0.870; 0.993	0.217	0.654
		Lisis-C	9	7.24 x 10 <sup>0</sup>	1.03 x 10 <sup>1</sup>	0.494	-0.102; 0.851	2.482	0.154
		qPCR	4	2.32 x 10 <sup>3</sup>	4.46 x 10 <sup>3</sup>	-0.005	-0.860; 0.876	1.050	0.381
	Aa	Referencia	3	4.33 x 10 <sup>1</sup>	4.04 x 10 <sup>1</sup>				
		Cultivo	3	4.10 x 10 <sup>1</sup>	4.94 x 10 <sup>1</sup>	0.985	0.668; 1.000	0.203	0.696
		Lisis-C	3	1.21 x 10 <sup>1</sup>	1.48 x 10 <sup>1</sup>	0.458	-0.226; 0.977	4.443	0.170
		qPCR	1	---	---	---	---	---	---
	Pg	Referencia	3	0.00 x 10 <sup>0</sup>	0.00 x 10 <sup>0</sup>				
		Cultivo	3	3.33 x 10 <sup>-1</sup>	5.77 x 10 <sup>-1</sup>	0.000	-0.950; 0.950	1.000	0.423
		Lisis-C	3	6.67 x 10 <sup>-1</sup>	1.15 x 10 <sup>0</sup>	0.000	-0.950; 0.950	1.00	0.423
		qPCR	1	---	---	---	---	---	---
	So	Referencia	3	1.07 x 10 <sup>1</sup>	1.15 x 10 <sup>0</sup>				
		Cultivo	3	9.00 x 10 <sup>0</sup>	1.39 x 10 <sup>1</sup>	0.225	-2.377; 0.975	0.052	0.841
		Lisis-C	3	8.93 x 10 <sup>0</sup>	9.80 x 10 <sup>0</sup>	0.299	-2.075; 0.978	0.120	0.762
		qPCR	2	4.55 x 10 <sup>3</sup>	6.30 x 10 <sup>3</sup>	0.117	-0.873; 0.960	1.067	0.410
10 <sup>2</sup>	Global	Referencia	9	1.18 x 10 <sup>3</sup>	3.09 x 10 <sup>3</sup>				
		Cultivo	9	6.43 x 10 <sup>2</sup>	1.60 x 10 <sup>3</sup>	0.811	0.404; 0.953	1.168	0.311
		Lisis-C	9	2.18 x 10 <sup>2</sup>	5.56 x 10 <sup>2</sup>	0.342	-0.318; 0.796	1.310	0.286
		qPCR	8	3.26 x 10 <sup>3</sup>	6.22 x 10 <sup>3</sup>	0.723	0.170; 0.936	2.522	0.156
	Aa	Referencia	3	3.28 x 10 <sup>3</sup>	5.30 x 10 <sup>3</sup>				
		Cultivo	3	1.71 x 10 <sup>3</sup>	2.76 x 10 <sup>3</sup>	0.813	-0.214; 0.995	1.150	0.396
		Lisis-C	3	5.86 x 10 <sup>2</sup>	9.65 x 10 <sup>2</sup>	0.341	-0.732; 0.975	1.154	0.395
		qPCR	2	8.57 x 10 <sup>3</sup>	1.21 x 10 <sup>4</sup>	0.840	-0.634; 1.000	0.886	0.519
	Pg	Referencia	3	2.67 x 10 <sup>1</sup>	2.89 x 10 <sup>1</sup>				
		Cultivo	3	1.46 x 10 <sup>2</sup>	2.40 x 10 <sup>2</sup>	0.240	-0.894; 0.969	0.950	0.432
		Lisis-C	3	1.11 x 10 <sup>1</sup>	1.88 x 10 <sup>1</sup>	0.778	-0.120; 0.993	7.231	0.115
		qPCR	3	2.04 x 10 <sup>2</sup>	1.68 x 10 <sup>2</sup>	-0.177	-0.496; 0.868	2.526	0.253

*Media, desviación estándar y coeficiente de correlación intraclase por concentración teórica.*

UFC/ml teórica	Bact	Técnica	n	Media (UFC/ml)	SD (UFC/ml)	ICC	95% IC	F	p
10 <sup>4</sup>	So	Referencia	3	2.47 x 10 <sup>2</sup>	2.72 x 10 <sup>2</sup>				
		Cultivo	3	7.90 x 10 <sup>1</sup>	5.63 x 10 <sup>1</sup>	0.341	-0.510; 0.972	1.820	0.310
		Lisis-C	3	5.75 x 10 <sup>1</sup>	4.00 x 10 <sup>1</sup>	0.223	-0.518; 0.962	1.964	0.296
		qPCR	3	2.78 x 10 <sup>3</sup>	4.52 x 10 <sup>3</sup>	0.117	-0.873; 0.960	1.067	0.410
	Global	Referencia	9	9.63 x 10 <sup>3</sup>	7.86 x 10 <sup>3</sup>				
		Cultivo	9	2.10 x 10 <sup>3</sup>	2.10 x 10 <sup>3</sup>	0.106	-0.201; 0.581	9.512	0.015
		Lisis-C	9	1.27 x 10 <sup>3</sup>	9.41 x 10 <sup>2</sup>	0.045	-0.201; 0.499	11.05	0.010
		qPCR	8	4.21 x 10 <sup>4</sup>	7.052 x 10 <sup>4</sup>	0.169	-0.445; 0.734	1.906	0.210
	Aa	Referencia	3	9.80 x 10 <sup>3</sup>	8.52 x 10 <sup>3</sup>				
		Cultivo	3	3.16 x 10 <sup>3</sup>	3.21 x 10 <sup>3</sup>	0.421	-0.257; 0.974	3.875	0.188
		Lisis-C	3	1.22 x 10 <sup>3</sup>	1.07 x 10 <sup>3</sup>	0.141	-0.292; 0.941	3.976	0.184
		qPCR	2	5.30 x 10 <sup>4</sup>	5.46 x 10 <sup>4</sup>	0.036	-0.974; 0.997	1.021	0.497
	Pg	Referencia	3	3.67 x 10 <sup>3</sup>	1.29 x 10 <sup>3</sup>				
		Cultivo	3	9.51 x 10 <sup>2</sup>	1.33 x 10 <sup>3</sup>	0.083	-0.147; 0.900	8.546	0.100
		Lisis-C	3	7.37 x 10 <sup>2</sup>	6.49 x 10 <sup>2</sup>	0.150	-0.037; 0.888	51.74	0.019
		qPCR	3	2.49 x 10 <sup>3</sup>	9.73 x 10 <sup>2</sup>	0.365	-0.310; 0.971	3.210	0.215
	So	Referencia	3	1.54 x 10 <sup>4</sup>	8.29 x 10 <sup>3</sup>				
		Cultivo	3	2.18 x 10 <sup>3</sup>	1.36 x 10 <sup>3</sup>	-0.105	-0.244; 0.783	5.647	0.141
		Lisis-C	3	1.85 x 10 <sup>3</sup>	1.02 x 10 <sup>3</sup>	-0.075	-0.218; 0.800	6.388	0.127
		qPCR	3	7.44 x 10 <sup>4</sup>	1.09 x 10 <sup>5</sup>	0.150	-0.882; 0.963	1.031	0.417

*UFC = unidades formadoras de colonia; Bact = Bacteria; SD = desviación estándar; ICC = coeficiente correlación intraclase; IC = intervalo de confianza.*

*Aa = A. actinomycetemcomitans; Pg = P. gingivalis So = S. oralis.*